

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: K0826001

UDC_____

厦门大学

硕士学位论文

溶藻弧菌生物膜形成特性及对药物耐受性研究

Characteristics of *Vibrio alginolyticus* Biofilm Formation and Its Antibiotic Resistance

姚刚

指导教师姓名: 郑天凌 教授

鄢庆枇 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2012 年 3 月

论文答辩日期: 2012 年 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2012 年 3 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

目录.....	I
Contents	V
摘要.....	1
Abstract.....	2
1.前言.....	4
1.1 溶藻弧菌研究概述	4
1.1.1 溶藻弧菌概述.....	4
1.1.2 溶藻弧菌的流行病学.....	4
1.1.3 由溶藻弧菌引起的养殖动物疾病.....	5
1.1.4 影响溶藻弧菌致病性的几个因素.....	5
1.1.5 溶藻弧菌的研究历史.....	9
1.2 生物膜概述及相关研究进展	10
1.2.1 生物膜概述.....	10
1.2.2 生物膜的观察.....	12
1.2.3 生物膜的形成过程.....	13
1.2.4 影响生物膜形成的重要因素.....	14
1.3 水产养殖业中抗生素的使用情况	16
1.4 生物膜的耐药机制	16
1.4.1 渗透屏障假说—胞外聚合物导致的生物膜耐药机制.....	17
1.4.2 微环境假说—环境限制因子导致的生物膜耐药机制.....	18
1.4.3 表型变异假说—基因型改变导致的生物膜耐药机制.....	19
1.5 本文的研究目的和意义	20
2.致病性溶藻弧菌生物膜形成特性研究	21
2.1 实验材料	21
2.1.1 菌株的来源.....	21

2.1.2 主要培养基.....	21
2.1.3 主要试剂.....	22
2.1.4 主要仪器.....	22
2.2 实验方法	22
2.2.1 菌株的复苏与培养.....	22
2.2.2 溶藻弧菌生物膜的形成与定量检测.....	23
2.2.3 不同培养时间下溶藻弧菌成膜情况测定.....	23
2.2.4 不同初始菌密度溶藻弧菌成膜情况测定.....	23
2.2.5 不同 NaCl 质量分数条件下溶藻弧菌成膜情况测定	23
2.2.6 不同初始 pH 条件下溶藻弧菌成膜情况测定.....	23
2.2.7 不同培养温度下溶藻弧菌成膜情况测定.....	23
2.2.8 钙镁离子对溶藻弧菌成膜情况影响.....	23
2.2.9 大黄鱼不同部位组织提取液对溶藻弧菌成膜影响.....	24
2.2.10 数据处理.....	24
2.3 结果与分析	24
2.3.1 溶藻弧菌不同时间成膜情况.....	24
2.3.2 溶藻弧菌不同初始密度条件下成膜情况.....	25
2.3.3 溶藻弧菌在不同 NaCl 质量分数条件下成膜情况	25
2.3.4 溶藻弧菌不同初始 pH 值条件下成膜情况.....	26
2.3.5 溶藻弧菌培养温度对成膜的影响.....	26
2.3.6 不同 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 质量分数对溶藻弧菌生物膜影响.....	27
2.3.7 大黄鱼不同部位组织提取液对溶藻弧菌成膜影响.....	28
2.4 讨论	28
3.溶藻弧菌生物膜耐药性研究	31
3.1 实验材料	31
3.1.1 菌株的来源.....	31
3.1.2 主要培养基.....	31
3.1.3 主要试剂.....	32
3.1.4 主要仪器.....	32

3.2 生物膜内的菌体活性测量	32
3.2.1 生物膜的构建.....	32
3.2.2 不同成膜时期生物膜活性测量.....	32
3.3 生物膜耐药性检测	32
3.3.1 微量稀释法测定 ND-01 菌株游离状态下 MBC.....	32
3.3.2 不同 MBC 倍数浓度的抗生素对成熟期生物膜的影响.....	34
3.3.3 10×MBC 浓度的抗生素对不同时期生物膜影响	35
3.4 结果与分析	36
3.4.1 不同成膜时期生物膜活性.....	36
3.4.2 生物膜耐药性分析.....	36
3.5 讨论	41
3.5.1 不同成膜时期生物膜活性比较.....	41
3.5.2 溶藻弧菌生物膜耐药性分析.....	41
4.结论与展望	44
4.1 结论	44
4.2 展望	44
参考文献	45
附录.....	52
附录一 攻硕期间参与的课题	52
附录二 已发表的文章	52
致谢.....	53

Contents

Abstract(in Chinese)	1
Abstract(in English)	2
1. Introduction	4
1.1 Review of study on <i>Vibrio alginolyticus</i>	4
1.1.1 Summary of <i>Vibrio alginolyticus</i>	4
1.1.2 Epidemiology of <i>Vibrio alginolyticus</i>	4
1.1.3 Aquatic animal disease caused by <i>Vibrio alginolyticus</i>	5
1.1.4 Factors that affect pathogenicity of <i>Vibrio alginolyticus</i>	5
1.1.5 Research history of <i>Vibrio alginolyticus</i>	9
1.2 Review of biofilm	10
1.2.1 Summary of biofilm	10
1.2.2 Observation of biofilm	12
1.2.3 Formation of biofilm	13
1.2.4 Factors that affect biofilm formation	14
1.3 The use of antibiotic in aquaculture	16
1.4 Antibiotic-resistance mechanism of biofilm	16
1.4.1 Diffusion barrier hypothesis — antibiotic-resistance caused by EPS	17
1.4.2 Microenvironment hypothesis — antibiotic-resistance caused by environmental restrict factor	18
1.4.3 Phenotypic variation hypothesis — antibiotic-resistance caused by genotype change	19
1.5 Purpose and significances of the study	20
2. Characteristics of <i>Vibrio alginolyticus</i> Biofilm Formation	21
2.1 Materials	21
2.1.1 Source of bacterial strain	21
2.1.2 Medium	21

2.1.3 Reagents.....	22
2.1.4 Instruments.....	22
2.2 Methods.....	22
2.2.1 Recovery and culture of strain	22
2.2.2 Formation and quantification of <i>Vibrio alginolyticus</i> biofilm	23
2.2.3 <i>Vibrio alginolyticus</i> biofilm formation at different time	23
2.2.4 <i>Vibrio alginolyticus</i> biofilm formation at different initial concentration of bacterial	23
2.2.5 <i>Vibrio alginolyticus</i> biofilm formation at different mass fraction of NaCl.....	23
2.2.6 <i>Vibrio alginolyticus</i> biofilm formation at different initial pH	23
2.2.7 <i>Vibrio alginolyticus</i> biofilm formation at different temperature.....	23
2.2.8 <i>Vibrio alginolyticus</i> biofilm formation at different concentration of MgCl ₂ 、CaCl ₂	23
2.2.9 <i>Vibrio alginolyticus</i> biofilm formation coated by different tissue ex- tract	24
2.2.10 Data analysis	24
2.3 Results	24
2.3.1 <i>Vibrio alginolyticus</i> biofilm formation at different time	24
2.3.2 <i>Vibrio alginolyticus</i> biofilm formation at different initial concentration of bacterial	25
2.3.3 <i>Vibrio alginolyticus</i> biofilm formation at different mass fraction of NaCl.....	25
2.3.4 <i>Vibrio alginolyticus</i> biofilm formation at different initial pH	26
2.3.5 <i>Vibrio alginolyticus</i> biofilm formation at different temperature.....	26
2.3.6 <i>Vibrio alginolyticus</i> biofilm formation at different concentration of MgCl ₂ 、CaCl ₂	27
2.3.7 <i>Vibrio alginolyticus</i> biofilm formation coated by different tissue ex- tract	28
2.4 Discuss.....	28

3. <i>Vibrio alginolyticus</i> Biofilm Antibiotic Resistance	31
3.1 Materials	31
3.1.1 Source of bacterial strain	31
3.1.2 Medium	31
3.1.3 Reagents	32
3.1.4 Instruments	32
3.2 Bacteria activity measurement of biofilm	32
3.2.1 Biofilm formation	32
3.2.2 Bacteria activity of different periods of biofilm formation	32
3.3 Antibiotic resistance of biofilm	32
3.3.1 MBC of antibiotics to free <i>Vibrio alginolyticus</i>	32
3.3.2 Antibiotics concentration of 1×MBC、2×MBC、5×MBC、10×MBC、20×MBC effects on mature <i>Vibrio alginolyticus</i> biofilm	34
3.3.3 Antibiotics concentration of 10×MBC effects on different periods of <i>Vibrio alginolyticus</i> biofilm	35
3.4 Results	36
3.4.1 Bacteria activity at different periods of biofilm	36
3.4.2 Analysis of biofilm antibiotic resistance	36
3.5 Discuss	41
3.5.1 Comparison of bacteria activity at different periods of biofilm	41
3.5.2 Analysis of biofilm antibiotic resistance	41
4. Conclusions and prospect	44
4.1 Conclusions	44
4.2 Prospect	44
References	45
Appendix	52
Appendix1: Research projects	52
Appendix2: List of papers	52

Acknowledgements	53
-------------------------------	-----------

厦门大学博士论文摘要库

摘要

溶藻弧菌是水产养殖业中最常见的致病菌之一，由其引发的弧菌病常常给海水养殖业造成巨大的损失，除此之外，溶藻弧菌还会引起人类的多种疾病。本文研究了溶藻弧菌生物膜形成特性，并比较了其对抗生素、庆大霉素、四环素、新霉素、卡那霉素、氧氟沙星和复方新诺明等 7 种水产常见药物的耐受性，旨在通过体外溶藻弧菌生物膜的培养和诱导，建立体外诱导溶藻弧菌生物膜形成的方法，并探索抑制生物膜的方法，为治疗溶藻弧菌导致的疾病提供新的实验依据。

通过改良的微孔板法研究致病性溶藻弧菌 ND-01 的生物膜形成特性。结果显示，在 28 °C 湿盒静止培养 16 h 左右，溶藻弧菌生物膜量达到峰值；菌液的初始密度在 $10^2 \sim 10^8$ CFU/mL 范围内，对于成膜量影响不显著；NaCl 质量浓度在 4.5% 时，生物膜量最大；pH 值在 7~8 时，成膜量最高；培养温度为 30 °C 时，对溶藻弧菌的生物膜量的影响最显著；加入 1.5% 的 CaCl_2 能显著促进生物膜形成，而 MgCl_2 则影响不显著；经过大黄鱼表皮粘液包被后，形成的生物膜量显著高于其他各部分组织液包被组。这些研究结果表明：致病性溶藻弧菌 ND-01 在体外能形成稳定而明显的生物膜，其生物膜的形成和多种环境因素有着密切关系。

使用 MTT 法测定溶藻弧菌生物膜的活性，并证明了溶藻弧菌生物膜对几种水产中常见抗生素药物具有耐受性。研究表明：随着时间的延长，溶藻弧菌生物膜膜内菌体活性逐渐增大，24 h 之后开始趋于平稳，但仍保持在较高水平；形成成熟生物膜后，其对抗生素的耐受性出现了显著的增强；氧氟沙星在较低浓度下对成熟期溶藻弧菌生物膜有杀灭作用，可能是一种潜在的治疗生物膜相关感染的有效药物；生物膜的成熟与其对药物的耐受性呈正相关。

关键词：溶藻弧菌；生物膜；形成特性；耐药性

Abstract

Vibrio alginolyticus is one of the common pathogens in aquaculture. The diseases it caused not only result tremendous economic loss, but also produce human disease. To build *V. alginolyticus* biofilm in vitro, and to explore methods that inhibit biofilm, characteristics of *V. alginolyticus* biofilm formation and its antibiotic resistance to streptomycin, gentamicin, tetracycline, neomycin, kanamycin, ofloxacin and compound sulfamethoxazole were study in this thesis.

A modified microtiter-plate test was introduced to determine the biofilm formation of pathogenic *V. alginolyticus* ND-01. Results showed that OD₅₉₀ of *V. alginolyticus* ND-01 biofilm was found to peak after 16 h; within the 10²~10⁸ CFU/mL, bacterial concentrations of *V. alginolyticus* exhibited no obviously effect on biofilm formation; OD₅₉₀ of bacterial biofilm fluctuated with different NaCl concentrations and peaked at 4.5%; the OD₅₉₀ values were remarkably higher at pH 7~9, and peaked at pH 7; OD₅₉₀ of bacterial biofilm increased with the incubation temperatures of 4°C~30°C and peaked at 30°C; addition of 1.5% CaCl₂ significantly promoted the bacterial biofilm formation while MgCl₂ played no significantly role; the OD₅₉₀ of biofilm developed on the surface of the microtiter plate coated by the skin mucus of large yellow croaker was significant. The results showed that *V. alginolyticus* ND-01 developed stable and evident biofilm *in vitro*, and the biofilm formation was remarkably affected by environmental factors, such as temperature, pH, NaCl concentration, and Ca²⁺ level. The results also showed that the bacterial biofilm formation of *V. alginolyticus* was governable, which would be useful for the epidemic control in fish culture.

V. alginolyticus biofilm activity and its resistance to antibiotics was measured with MTT test. Results showed that *V. alginolyticus* biofilm activity enhanced with culture time, and gradually stabilized after 24 h; Antibiotic resistance of *V. alginolyticus* in mature biofilm was more strengthened than free bacteria; ofloxacin can kill *V. alginolyticus* biofilm at low concentration, which would be potential and useful drug that treat relevant diseases; mature of biofilm and its antibiotic resistance

had positive significance correlation.

Key words: *Vibrio alginolyticus*; Biofilm; Characteristics; Antibiotic resistance

厦门大学博士论文摘要库

1.前言

1.1 溶藻弧菌研究概述

1.1.1 溶藻弧菌概述

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*), 隶属于弧菌科(Vibrionaceae)、弧菌属(*Vibrio*), 是一种革兰氏阴性菌。溶藻弧菌胞外无荚膜, 生长过程中无芽孢形成, 菌体常呈现“C”或“S”型^[1], 在IP培养基上27℃下培养24h菌体大小为 $(0.6\sim0.9) \times (1.2\sim1.5) \mu\text{m}$ ^[2], 在TCBS培养基上27℃下培养20h, 能够形成嫩黄绿色菌落。溶藻弧菌是一种常见兼性海洋弧菌, 广泛分布于世界各地的沿海水域以及海底沉淀物中, 喜好在温度17~35℃、盐度5~25%的环境中生存^[3]。溶藻弧菌作为海洋中的正常菌群, 受其影响的海洋水生生物种类众多。在常见的海洋鱼、虾、贝以及棘皮动物等海水养殖的水产品中均检测出过溶藻弧菌^[4-6]。

1.1.2 溶藻弧菌的流行病学

溶藻弧菌是一种常见的条件致病菌, 能够感染多种海水养殖产品。由溶藻弧菌引起的弧菌病多发生在每年的夏季和秋季, 宿主被溶藻弧菌感染后往往会出现生存状态异常现象, 如: 当对虾被溶藻弧菌感染后, 其体表的外壳会受到侵蚀, 逐步的丧失游泳能力而导致死亡; 斜点带石斑鱼在感染溶藻弧菌后会出现烂鳍、烂眼等情况^[7]。溶藻弧菌的分布范围广泛, 并且数量巨大, 是海洋当中最常见的弧菌之一, 因此由溶藻弧菌导致的弧菌病一旦在某地集中爆发, 能够在较大范围内影响当地的渔业生产, 对当地的水产养殖业造成巨大的经济损失。2004年, 西班牙西北部的Galicia地区爆发了由溶藻弧菌导致的弧菌病, 对当地的一种主要的海水贝类产品的养殖造成了巨大影响, 并给当地经济造成了严重损失^[4]。近些年来, 在我国的台湾地区 and 南方的海水养殖地区也频频发生由于溶藻弧菌感染养殖水产品而造成巨大经济损失的事件^[8, 9]。溶藻弧菌不仅能感染养殖的水产品, 也能导致人类患病。溶藻弧菌能够感染人体主要是由于被感染者接触或食用被溶藻弧菌污染的水产品而造成的。有报道称, 在冻虾仁产品中曾多次检测出溶藻弧菌^[5], 封会茹等^[10]则报道了溶藻弧菌能够引起人类食物中毒。1979年Schmidt等^[11]就报道过一起由于溶藻弧菌感染而导致眼部出现化脓感染的事件; 2004年

Ardic^[12]则报道了溶藻弧菌进入耳道后，能够引起人类的中耳炎。因此可以说，重视溶藻弧菌的致病性对于人们的食品安全、自身健康以及社会经济发展是十分必要的。

溶藻弧菌导致弧菌病暴发的原因主要在于几个方面：首先，溶藻弧菌的致病性与其生存环境中的温度因素有着密不可分的关系。溶藻弧菌是一种嗜温菌，其生长繁殖和生存环境中的温度变化之间关联密切。胡超群等^[13]发现在25~32℃条件下，由溶藻弧菌导致的水产疾病比较容易暴发，在28℃以上则极容易流行，因此在防治溶藻弧菌的时候首先应当关注养殖环境中的温度因素。其次，溶藻弧菌的致病性与宿主本身的免疫能力也有一定关系。宿主的自身免疫力的下降使得溶藻弧菌更容易侵入宿主的机体，从而引发相应的弧菌病，使得宿主生理机能下降，最后出现死亡现象。另外，宿主本身的生存环境也是溶藻弧菌暴发和流行的一个重要因素。研究发现，一些环境因子的胁迫作用会影响宿主的免疫力，从而使得宿主感染几率上升、死亡率增加。Yeh^[14]将感染后的南美白对虾分别放置于铜离子浓度为0、1、5、10、20 mg/L的海水中，24~96 h后对虾死亡率分别为16.7%、16.7%、50.0%、43.3%、46.7%。说明在铜离子浓度高于1 mg/L的情况下，对虾对于溶藻弧菌的免疫力下降、敏感度增强，容易被侵染患病，从而导致死亡率上升。

1.1.3 由溶藻弧菌引起的养殖动物疾病

溶藻弧菌是海水养殖动物的常见致病菌，其爆发性流行给海水养殖业带来巨大的经济损失，由其引起的养殖动物疾病见表 1.1。

1.1.4 影响溶藻弧菌致病性的几个因素

溶藻弧菌整个致病过程大致可以分成以下几步：黏附、侵袭、体内增殖及产生毒素等，通过这一系列步骤，溶藻弧菌从宿主体表侵入到机体深处，并且在其侵袭和增殖过程中，会对宿主本身的机体造成细胞和组织损伤。由于溶藻弧菌自身的代谢作用所产生的一些代谢产物(主要是毒素)，会对宿主的机体产生干扰和破坏，导致宿主的局部或全身的正常新陈代谢机能失常，从而引发宿主的生理异常和死亡^[1]。溶藻弧菌的整个致病过程中，这几个步骤是彼此缺一不可的，通过这几个步骤，菌体完成对宿主的侵入，并定植在宿主的体内。

表 1.1 由溶藻弧菌引起的养殖动物疾病

Table 1.1 Diseases caused by *Vibrio alginolyticus*

感染宿主	疾病	症状	LD ₅₀ (CFU/g)	发病地点
黑鲷 ^[1] (<i>Sparus aurata</i> L)	弧菌病	表皮溃疡、出血、有黑斑，眼球突出、充血，腹部肿胀，肝脏充血，肾脏苍白，脾脏肿大，有小瘤	5.4×10 ⁴ ~ 1.0×10 ⁶	西班牙西南部
平鲷 ^[1] (<i>Sparus sarba</i>)	体表溃疡病	开始体色变深，感染部位和鳍末端充血、发炎，严重时鳍间组织逐渐散开，鳍条溃烂，体表感染部位发生溃烂，溃烂逐渐变成一深洞，最终死亡		中国香港
大黄鱼 ^[1] (<i>Pseudosciaena crocea</i>)	弧菌病	鱼体发白，体表点状发红，下颌、眼球、腹部及各鳍基发红，鳍散裂，肝、肾、脾充血肿大		福建宁德 浙江宁波
杂色鲍 ^[15]	弧菌病	幼体附在采苗板上生长期间，绝大部分鲍苗第一呼吸孔尚未形成之前先变白，1~2天内脱板死亡		台湾省 福建省 海南省
牙鲆 ^[16] (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	弧菌病	体色变黑、摄食不活跃，鱼鳍等部位出现出血点，腹部鼓突，肛门红肿、轻轻挤压有脓状液体流出。肝、肾脏充血肿大，肠壁充血，有的鱼体肠内充满略带黄色的液体		山东荣成
三疣梭子蟹 ^[17] (<i>Portunus trituberculatus</i>)	弧菌病	蟹体体表无明显症状，但活动能力减弱，对外界刺激反应迟钝或无反应，极易捕捞。抽取的血淋巴液不再呈淡蓝色而变轻微浑浊或微红色，凝固缓慢。偶见步足及游泳足呈红色，关节处有肿胀。解剖可见内脏器官组织有明显变化，鳃内混浊物质增多，肝胰腺略有弥散，体腔浊液增多		

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库